

УДК 581.52:581.95

О.А. ІГНАТЮК¹, Л.П. ГАПОНОВА¹, І.Д. ОМЕРІ²

¹ Науковий центр екомоніторингу та біорізноманіття мегаполісу НАН України
Україна, 03143 м. Київ, вул. Акад. Лебедева, 37

² Київський університет імені Бориса Грінченка
Україна, 02152 м. Київ, пр. Тичини, 17

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНИХ І ХІМІЧНИХ АГЕНТІВ НА ПРОРОСТАННЯ ПИЛКУ ІНВАЗІЙНОГО ВИДУ *IMPATIENS PARVIFLORA* DC. (BALSAMINACEAE)

В умовах *in vitro* досліджено проростання пилку інвазійного однорічника *Impatiens parviflora* DC. на різних типах культурального середовища ізольовано та за наявності пилку інших видів. Запропоновано кількісний показник, який характеризує напрямок та силу взаємного впливу пилку різних видів, — індекс ПАС (показник антагонізму-синергізму). Встановлено пригнічення проростання пилку *Impatiens parviflora* пилком *Rudbeckia hirta* L., *Rubus serpens* Weihe ex Lej. & Court. та стимуляцію пилком *Lysimachia nummularia* L. За допомогою методології двофакторного експерименту показано, що наявність виду-антагоніста (біологічний агент) більшою мірою пригнічує проростання пилку *Impatiens parviflora*, ніж наявність фізіологічно активної речовини (хімічний агент).

Ключові слова: *Impatiens parviflora*, пилко, синергізм, антагонізм, регуляція епігенетичних процесів, репродукція квіткових рослин.

Нині загрозою для збереження біорізноманіття є антропогенно стимульоване поширення адвентивних видів рослин і тварин. Зазвичай адвентивні види успішно здійснюють експансію внаслідок наявності високого репродуктивного потенціалу та його успішної реалізації за певних умов [1]. Виявлення нетоксичних видоспецифічних інгібіторів генеративної сфери, зокрема процесів проростання пилкових зерен, дасть змогу пригнічувати запліднення, а, відповідно, й утворення насіння у тих видів квіткових рослин, поширення яких у природних біоценозах є небажаним. Насамперед це стосується однорічних видів трав'янистих рослин. Такі дослідження дають змогу розробити новітні екобіотехнології [5] регуляції біорізноманіття, які ґрунтуються на використанні біотичних взаємозв'язків між видами та реалізуються за рахунок впливу на біоценотичні процеси. Інакше кажучи, для запобігання поширенню небажаних видів слід застосовувати біологічні агенти, які є природними антагоністами таких видів і пригнічують

процеси їх росту та відтворення на епігенетичному рівні.

Дослідження останніх років показали [2], що найбільш поширеним та ценотично-агресивним видом у міських та приміських лісах Києва є *Impatiens parviflora* DC. (розрив-трава дрібноквіткова), що домінує в трав'янистому ярусі більшості лісових угруповань і суттєво зменшує біорізноманіття цієї синузії. З огляду на однорічність життєвого циклу цього виду, дієвим способом регуляції його відтворення слід вважати саме пригнічення насінневої продуктивності.

Мета досліджень — пошук нетоксичних видоспецифічних інгібіторів чоловічої статеві сфери *I. parviflora*.

Основну увагу приділяли добору біологічних, а не хімічних агентів впливу — пошуку інформації щодо існування антагоністичних взаємозв'язків між *I. parviflora* і видами дикорослих чи культурних рослин, які цвітуть одночасно з цим видом та зростають у межах одного ценозу (парк «Феофанія»). Для досягнення поставленої мети нами *in vitro* було проведено серію дослідів з роздільного та спільного пророщування

пилку 9 видів квіткових рослин, які цвіли одночасно.

Матеріал та методи

Матеріалом слугував свіжозібраний пилкок таких видів квіткових рослин: *Impatiens parviflora*, *Geranium robertianum* L., *Convolvulus arvensis* L., *Rudbeckia hirta* L., *Rubus serpens* Weihe ex Lej. & Court., *Lysimachia nummularia* L., *Origanum vulgare* L., *Epilobium parviflorum* Schreb., *Nemerocallis fulva* L. Пилкок збирали в червні–липні 2012 р. на території парку-пам'ятки садово-паркового мистецтва загальнодержавного значення «Феофанія».

За основу для постановки дослідів з роздільного та спільного пророщування пилку обрано методику, розроблену І.Н. Голубинським [4]. Пилкок пророщували в краплі середовища на поверхні предметного скельця, розташованого у вологій стерильній камері (чашка Петрі зі зволоженням фільтрувальним папером). Об'єм краплі у досліді становив 1 мкл. Дозування об'єму проводили з використанням дозатора Micro Pette Ulab 0,5–10,0 мкл. Рівномірність розподілу пилку в краплі забезпечували з використанням біокуляра SZM-45T2. При пророщуванні пилку використовували три типи середовища: дистильована вода, 14 % водний розчин $C_{12}H_{22}O_{11}$, 0,03 % водний розчин H_3BO_3 . Розчин сахарози в якості середо-

вища імітував цукристі виділення приймочки маточки [6], а борна кислота є відомою фізіологічно активною речовиною, яка регулює проростання пилку [7]. Досліди проводили в трьох повторях як при роздільному (контроль), так і при спільному (дослід) пророщуванні пилку. Інкубація кожного варіанта тривала (24 ± 1) год при кімнатній температурі. Предметні скельця з пророслими пилковими зернами проглядали з використанням мікроскопа Olympus BX-51 з DIC-контрастом та фотокамерою. Для кожної проби в трьох полях зору, які не перекриваються, робили цифрові фотографії та підраховували кількість пророслих і непророслих пилкових зерен. Проростання оцінювали як відношення кількості пророслих пилкових зерен до загальної кількості пилкових зерен для кожного виду і виражали у відсотках.

Отримані результати оброблено загальноприйнятими статистичними методами з використанням програмних пакетів Microsoft Excel та Statistica.

Результати та обговорення

З дев'яти досліджених видів рослин пилкок лише п'яти видів успішно проростав *in vitro*. Результати впливу типу культурального середовища при роздільному пророщуванні пилку модельних видів (5 аборигенних та 4 адвентивних) наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Вплив типу культурального середовища на відсоток проростання пилку модельних видів рослин

Вид	Показник проростання, %		
	H_2O (dist)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	H_3BO_3
<i>Impatiens parviflora</i>	$6,19 \pm 5,96$	$5,58 \pm 4,89$	$4,53 \pm 2,10$
<i>Geranium robertianum</i>	0	0	0
<i>Convolvulus arvensis</i>	0	0	0
<i>Rudbeckia hirta</i>	0	$3,05 \pm 1,22$	0
<i>Rubus serpens</i>	$70,37 \pm 43,12$	$94,19 \pm 1,66$	$46,86 \pm 29,18$
<i>Lysimachia nummularia</i>	$15,50 \pm 11,35$	$7,17 \pm 3,47$	$2,08 \pm 3,60$
<i>Epilobium parviflorum</i>	100	100	0
<i>Origanum vulgare</i>	0	0	0
<i>Nemerocallis fulva</i>	0	0	0

Аналізуючи результати, наведені у табл. 1, можна дійти висновку, що найоптимальнішим для проростання пилку виявився розчин сахарози. В цьому варіанті середовища проростання відзначене для п'яти досліджених видів. Адвентивний вид *Impatiens parviflora*, який є головним об'єктом наших досліджень, проростає успішно на всіх типах середовища. Перевірка відмінностей між різними варіантами дослідів з використанням критерію Фішера ($p=0,05$) показала відсутність достовірних відмінностей у впливі типу середовища. Подібну закономірність відзначено нами також для аборигенного виду *Lysimachia nummularia*. Інший аборигенний вид — *Rubus serpens* продемонстрував достовірне ($p=0,05$) підвищення показника проростання на сахарозному розчині порівняно як з дистильованою водою, так і з розчином борної кислоти.

Звертає увагу факт повного інгібування проростання *Epilobium parviflorum* розчином борної кислоти. Враховуючи повідомлення [7] щодо здатності цієї хімічної сполуки відігравати роль фізіологічно активної речовини та посилювати проростання пилку, можна припустити інгібування проростання внаслідок надмірної кількості фізіологічно активної речовини, оскільки підбір концентрацій спеціально не проводили. Можна припустити також помилки при постановці дослідів, хоча результат для трьох повторів виявився однаковим.

Вплив густоти посіву пилку на здатність до проростання та інтенсивність росту пилкових трубок ми не вивчали, оскільки, провівши значну кількість дослідів (15 видів з 14 родів та 11 родин), І.М. Голубинський сформував чітке уявлення про ці процеси [4]. До його дослідів було залучено як аборигенні (6), так і адвентивні (9) види. В усіх випадках автор спостерігав позитивний вплив густоти посіву на проростання пилку та інтенсивність росту пилкових трубок.

Пилком чотирьох видів (*Geranium robertianum*, *Convolvulus arvensis*, *Origanum vulgare* та *Nemerocallis fulva*) в жодному варіан-

ті дослідів не проростав. Тому для подальших досліджень ці види не використовували.

Досліди з пророщування пилку в полікультурі (попарно) проводили з використанням в якості середовища розчину сахарози, оскільки така постановка дослідів дала змогу отримати максимальну кількість пар видів, показники проростання пилку яких можна порівнювати. Достовірність відмінностей оцінювали з використанням критерію Фішера.

Для більш об'єктивного кількісного порівняння результатів різних варіантів дослідів ми запропонували індекс ПАС — показник антагонізму-синергізму (відношення показника проростання пилку в монокультурі (контроль) до показника проростання пилку в полікультурі (дослід)). Цей індекс є безрозмірним. Індекс ПАС кількісно характеризує стимуляцію або інгібування. У разі, якщо значення показника перевищує одиницю (при проростанні пилку спостерігається антагонізм) це свідчить про інгібування, у разі, якщо значення показника менше за одиницю (при проростанні пилку спостерігається синергізм), це свідчить про стимуляцію.

Результати дослідів із спільного пророщування пилку *Impatiens parviflora* в комбінаціях з пилком *Rudbeckia hirta*, *Rubus serpens*, *Lysimachia nummularia* та *Epilobium parviflorum* наведено у табл. 2.

Аналізуючи результати, наведені у табл. 2, можна відзначити наявність як антагоністичних, так і синергічних зв'язків між пилком досліджуваних видів. У цілому антагонізм виявляється істотніше, ніж синергізм.

Найбільш суттєве пригнічення проростання пилку *Impatiens parviflora* зумовлене наявністю пилку *Rudbeckia hirta*. Біотичні зв'язки в цій парі характеризуються як позитивно-негативні та за результатом фактично відповідають зв'язкам типу хижак-жертва або паразит-хазяїн, але, безумовно, мають іншу природу та біологічне значення. Очевидно, у пилку *R. hirta* наявний

Таблиця 2. Взаємний вплив пилку на показники проростання у відповідних парах досліджуваних видів

Вид	Показник проростання, %		F-критерій	ПАС
	Монокультура	Полікультура		
Impatiens parviflora ↔ Rudbeckia hirta				
I. parviflora	4,63±2,95	1,88±0,44	44,95 *	2,46
R. hirta	3,05±1,22	5,57±4,01	10,80 **	0,55
Impatiens parviflora ↔ Rubus serpens				
I. parviflora	5,83±4,04	3,66±1,29	9,81 **	1,59
R. serpens	94,19±1,66	92,33±13,28	64,0 *	1,02
Impatiens parviflora ↔ Lysimachia nummularia				
I. parviflora	7,35±4,33	18,33±26,73	38,11 *	0,40
L. nummularia	7,17±3,42	20,05±10,27	9,01 **	0,36
Impatiens parviflora ↔ Epilobium parviflorum				
I. parviflora	11,60±2,86	10,12±2,73	1,09	1,15
E. parviflorum	100	100	—	1,00

Примітка: * — $p=0,05$; ** — $p=0,1$.

певний агент хімічної природи, який потрапляє в середовище при його проростанні та інгібує проростання пилку *I. parviflora*. Запропонований гіпотетичний механізм інгібування можна також використати для пояснення стимуляції проростання пилку *R. hirta*. Гіпотезу стимуляції за рахунок послаблення конкуренції за енергетичний ресурс (сахарозу) в даному випадку ми вважаємо хибною, оскільки щільність висіву пилку у варіантах дослідів «полікультура» та «монокультура» була приблизно однаковою, а ефективність проростання зросла майже вдвічі. Пошук гіпотетичного агента інгібування (або стимуляції) та з'ясування відповідних механізмів взаємного впливу пилку в цій парі потребує подальших досліджень.

Наступний варіант дослідів (*Impatiens parviflora* ↔ *Rubus serpens*) виявив взаємний антагонізм пилку досліджуваних видів. У цій парі пригнічення було менш суттєвим, ніж у попередній, однак взаємним. Як за результатом, так і за біологічним значенням це типова конкуренція. Для пояснення механізму інгібування проростання пилку *R. serpens* цілком придатна гіпотеза конкуренції за ресурс, оскільки цей

Таблиця 3. Ефекти впливу виду-антагоніста і типу культурального середовища на проростання пилку *Impatiens parviflora* в парі *Impatiens parviflora* ↔ *Rubus serpens*

Фактор	Ефект	Стандартне відхилення	p	Коефіцієнт регресії
H ₃ BO ₃	– 2,48	1,01	0,05	– 1,24
<i>Rubus serpens</i>	– 3,35	1,01	0,02	– 1,67
Взаємодія між факторами	– 1,18	1,01	0,2	– 0,59

вид за відсутності сахарози проростає гірше (див. табл. 1). Пригнічення проростання пилку *I. parviflora*, зумовлене наявністю пилку *R. serpens*, пояснити складніше, оскільки наявність сахарози на ефективність проростання пилку *I. parviflora* суттєво не впливає (див. табл. 1). Тому найбільш ймовірною, як і для попередньої пари, є гіпотеза про наявність агента інгібування хімічної природи.

Для пари *Impatiens parviflora* ↔ *Lysimachia nummularia* виявлено взаємну стимуляцію ефективності проростання пилку,

яку можна інтерпретувати як протокооперацію. Пояснити механізми взаємодії, які дають подібний результат, без участі агентів хімічної природи біологічного походження практично неможливо.

Таким чином, у трьох попарних варіантах дослідів з чотирьох результати підтверджують нашу гіпотезу про існування специфічних біологічно активних речовин невідомої природи, які впливають на ефективність проростання пилку.

З даних, наведених у табл. 1 та 2, видно, що як наявність фізіологічно активної речовини у середовищі культивування (H_3BO_3), так і вид-антагоніст (*Rubus serpens*) пригнічують проростання пилку *Impatiens parviflora*. Тому для з'ясування особливостей зазначених ефектів нами було застосовано методологію багатофакторного експерименту — побудовано відповідну матрицю повного двофакторного експерименту, в якій як перший фактор використано наявність-відсутність виду-антагоніста, а як другий — наявність-відсутність фізіологічно активної речовини (H_3BO_3) у культуральному середовищі. *Rubus*-матрицю було оброблено з використанням методики ANOVA (табл. 3).

Проведене статистичне дослідження сили впливу пилку виду-антагоніста (*Rubus serpens*) та фізіологічно активної речовини (H_3BO_3) на проростання пилку *Impatiens parviflora* з використанням методології двофакторного експерименту виявило, що наявність пилку виду-антагоніста зумовлює у 1,5 разу сильніший ефект, ніж наявність фізіологічно активної речовини. Взаємодія між дослідженими факторами виявилася негативною, хоча і з дуже низьким рівнем статистичної значущості. Це дає підставу зробити припущення про доцільність застосування біологічних агентів та їх перевагу порівняно з хімічними агентами для розробки біотехнологій регуляції чисельності та щільності агресивного адвентивного однорічника *I. parviflora*.

Висновки

Таким чином, проростання пилку *Impatiens parviflora* пригнічується наявністю пилку *Rudbeckia hirta* та *Rubus serpens* у 2,5 та 1,6 разу відповідно, а наявність пилку *Lysimachia nummularia*, навпаки, стимулює проростання у 2,5 разу. Пилок *Epilobium parviflorum* суттєвого впливу на проростання пилку *Impatiens parviflora* не виявив. Як стимуляцію, так і інгібування проростання пилку в досліджених варіантах, найімовірніше, можна пояснити наявністю в культуральному середовищі біологічно активних речовин, які виділяються при проростанні пилку відповідного виду. Відкритим залишаються питання щодо видоспецифічності дії та хімічної природи (належності до певного класу хімічних сполук) цих біологічно активних речовин.

1. Бурда Р.І., Ігнатюк О.А. Методика дослідження адаптивної стратегії чужорідних видів рослин у урбанізованому середовищі. — Київ: НЦЕБМ НАН України, ЗАЕ «Віпол», 2011. — 112 с.
2. Бурда Р.І. Адвентивний вид *Impatiens parviflora* DC (Balsaminaceae) у міських лісах Києва // Укр. ботан. журн. — 2012. — **69**, № 3. — С. 352–362.
3. Вент ван Дж.Л., Виллемсе М.Т.М. Оплодотворение / Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии. — М.: Агропромиздат, 1990. — Т. 1. — С. 317–366.
4. Голубинский И.Н. Биология прорастания пыльцы. — К.: Наук. думка, 1974. — 368 с.
5. Кухар В., Кузьмінський Є., Ігнатюк О., Голуб Н. Екобіотехнологія та біоенергетика: проблеми становлення і розвитку // Вісн. НАН України. — 2005. — № 9. — С. 3–18.
6. Chittka L., Schurkens S. Successful invasion of a floral market: an exotic plant has moved in on Europe's river banks by bribing pollinator // Nature. — 2001. — Vol. 411. — P. 653–655.
7. Wang Q., Lu L., Wu X., Li Y. and Lin J. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri* // Tree Physiology. — 2003. — Vol. 23. — P. 345–351.

Рекомендував до друку
В.І. Мельник

А.А. Игнатюк¹, Л.П. Гапонова¹, И.Д. Омери²

¹ Научный центр экомониторинга и биоразнообразия мегаполиса НАН Украины, Украина, г. Киев

² Киевский университет имени Бориса Гринченко, Украина, г. Киев

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА ПРОРАСТАНИЕ ПЫЛЬЦЫ ИНВАЗИВНОГО ВИДА *IMPATIENS PARVIFLORA* DC. (BALSAMINACEAE)

Методом *in vitro* исследовано прорастание пыльцы инвазивного однолетника *Impatiens parviflora* DC. на разных типах культуральной среды изолированно и в присутствии пыльцы других растений. Предложен количественный показатель, который характеризует направление и силу взаимного влияния пыльцы разных растений, — индекс ПАС (показатель антагонизма-синергизма). Установлено угнетение прорастания зерен пыльцы *Impatiens parviflora* пыльцой *Rudbeckia hirta* L., *Rubus serpens* Weihe ex Lej. & Court. и стимуляция пыльцой *Lysimachia nummularia* L. При помощи методологии двухфакторного эксперимента показано, что наличие вида-антагониста (биологического агента) более существенно угнетает прорастание пыльцы *Impatiens parviflora*, чем наличие физиологически активных веществ (химический агент).

Ключевые слова: *Impatiens parviflora*, пыльца, синергизм, антагонизм, регуляция эпигенетических процессов, репродукция цветковых растений.

O.A. Ihnatiuk¹, L.P. Gaponova¹, I.D. Omeri²

¹ Megalopolis Ecomonitoring and Biodiversity Research Centre, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Kyiv

² Boris Grinchenko Kyiv University, Ukraine, Kyiv

EFFECTS OF THE BIOLOGICAL AND CHEMICAL AGENTS ON THE POLLEN GERMINATION OF INVASIVE SPECIES *IMPATIENS PARVIFLORA* DC. (BALSAMINACEAE)

Pollen germination of invasive species *Impatiens parviflora* DC. is investigated in different mediums separately and together with pollen grains of other plants using method *in vitro*. The score which characterize direction and intensity of different plants pollen interference — IAS (antagonism–synergism index) — is devised. The inhibition of pollen grains germination of *Impatiens parviflora* by pollen *Rudbeckia hirta* L., *Rubus serpens* Weihe ex Lej. & Court. and stimulation by pollen *Lysimachia nummularia* L. is observed. The methodology of two-factor experiment is revealed that the presence of antagonist species (biological agent) more severely increased effectiveness of pollen germination *Impatiens parviflora* than the presence of physiologically active substances (chemical agents).

Key words: *Impatiens parviflora*, pollen, synergism, antagonism, regulation of epigenetic processes, reproduction of flowering plants.